

Спектрофотометрическое определение суммы фенольных соединений в растительных объектах с использованием хлорида алюминия, 18-молибдодифосфата и реактива Фолина-Чокальтеу

Т.А. Денисенко*, А.Б. Вишник, Л.П. Цыганок

*Днепропетровский национальный университет им. Олеса Гончара,
Украина, 49010, г. Днепропетровск, пр. Гагарина 72,*

*Адрес для переписки: Денисенко Татьяна Александровна, E-mail: denisenko_tatyana@i.ua

Поступила в редакцию 16 сентября 2015 г., после исправлений – 16 ноября 2015 г.

На основании результатов анализа ряда лекарственных препаратов на основе растительного сырья (таблетки, настои, сиропы), лекарственных растений, фруктов, чаев и т.п. установлено, что 18-молибдодифосфорный ГПК структуры Доусона (18-МФК), как и реактив Фолина-Чокальтеу (ФЧ), пригоден для спектрофотометрического определения суммы фенольных соединений. Этот вывод подтверждается высокой степенью корреляции ($R^2 > 0.95$) между данными, полученными двумя методами. Результаты анализа обеими методами во многих случаях практически не отличаются по абсолютной величине, что свидетельствует о близости кажущихся молярных коэффициентов, рассчитанных для реакций фенольных соединений с указанными реагентами. В случае, если общее содержание полифенолов определяется присутствием флавонолов или оксикоричных кислот, то взаимодействие последних с 18-МФК является быстрым и полным при проведении реакции при pH = 7.4. Для определения менее реакционноспособных фенольных соединений (полимерные полифенолы, катехины, оксibenзойные кислоты) оптимальной является область pH выше 9.0. Корреляция результатов определения суммы полифенолов, полученных с использованием 18-МФК или реактива ФЧ, с результатами методики, использующей хлорид алюминия, наблюдается только в том случае, если в растениях преобладают флавоны, имеющие гидроксильные группы в положении 3 и/или 5.

Ключевые слова: реактив Фолина-Чокальтеу, 18-молибдодифосфат, хлорид алюминия, спектрофотометрия, определение фенолов

For citation: *Analitika i kontrol'* [Analytics and Control], 2015, vol. 19, no. 4, pp. 373-380

DOI: 10.15826/analitika.2015.19.4.012

Spectrophotometric determination of sum of phenolic compounds in plants using aluminum chloride, 18-molybdodiphosphate and Folin-Ciocalteu reagents

T.A. Denisenko*, A.B. Vishnikin, L.P. Tsiganok

*Faculty of Chemistry, Oles Honchar Dnipropetrovsk National University,
72, Gagarin Ave., Dnipropetrovsk, 49010, Ukraine*

*Corresponding author: Tatyana A. Denisenko, E-mail: denisenko_tatyana@i.ua

Submitted 16 September 2015, received in revised form 16 November 2015

It was concluded from the results of the analysis of a number of drugs on the basis of vegetable raw materials such as tablets, tinctures, syrups, medicinal plants, fruits, teas, etc., that 18-molybdodiphosphate heteropoly anion (18-MPA) and Folin-Ciocalteu (FCR) reagents were suitable for the spectrophotometric determination of the total content of phenolic compounds. This conclusion was confirmed by a high degree of correlation ($R^2 > 0.95$) between the results obtained by two methods. In many cases, the absolute difference between the results of both methods was low, and that was an evidence of closeness of apparent molar absorptivity values calculated for the reactions with the above mentioned reagents. Interaction of polyphenols with 18-MPA at pH 7.4 was rapid and complete when the total content of polyphenols was determined by the presence of flavonols or cinnamic acids. Range of pH > 9.0 was optimal for the determination of less

reactive compounds (polymeric polyphenols, catechins, oxybenzoic acids). The results for the determination of sum of polyphenols obtained with 18-MPA or FCR reagents correlated with the results obtained using the aluminium chloride method only in the case when flavons with hydroxy groups in the positions 3 and/or 5 were dominating phenol species present in the plants.

Keywords: 18-molybdophosphate heteropoly complex, Folin-Ciocalteu reagent, aluminium chloride, spectrophotometric analysis, determination of phenols

ВВЕДЕНИЕ

Фенольные соединения являются важнейшей составляющей частью растительных объектов. Синтез полифенолов в клетках животных и человека невозможен, поэтому они поступают в организм преимущественно с растительной пищей, оказывая при этом на него в целом благотворное влияние. Сведения о наличии тех или иных фенольных соединений в растениях, овощах, фруктах, чае и других напитках является основой «правильного питания». Однако интерес к полифенолам обусловлен не только пищевой полезностью, а и перспективой получения на их основе новых высокоактивных лекарственных препаратов, обладающих антиоксидантным, противовоспалительным, антиканцерогенным, противовирусным, антипаразитарным и антибактерицидным действием. Критерии качества, предъявляемые к растительному сырью, содержащему полифенолы, постоянно возрастают, а вместе с тем повышаются требования к методам их идентификации и определения. Поэтому оптимизация существующих и создание новых методик является приоритетной задачей при изучении фенольных соединений растительного происхождения.

Для определения суммы фенолов в широком круге объектов, в том числе в лекарственных препаратах на основе растительного сырья, наиболее широко применяются спектрофотометрические методики, основанные на их окислении в щелочной среде реактивом Фолина-Чокальтеу (ФЧ), в состав которого входит смесь разнوليгандных молибдодвольфрамовых гетерополикомплексов структуры Доусона $\text{Na}_6\text{P}_2\text{Mo}_n\text{W}_{18-n}\text{O}_{62}$ ($n = 4-5$) [3–5]. Недавние исследования показали, что общее содержание фенолов, определяемое методом ФЧ, коррелирует с антиоксидантной активностью, определяемой различными методами (к примеру, ABTS^{••} и DPPH[•]) [6, 7]. Для оценки общего содержания флавоноидов часто предлагается использовать методику, основанную на измерении оптической плотности растворов при 410–430 нм после добавления раствора хлорида алюминия [9]. Между тем, поглощение в этой области дают только флавонолы и другие флавоны, имеющие в молекуле гидроксильные группы в положении 3 и/или 5 [8–9]. В присутствии нитрита натрия в щелочной среде при взаимодействии катехинов и некоторых других полифенолов с AlCl_3 появляется поглощение в области 510 нм [9].

При наличии в растительных образцах флаванонов и дигидроксифлавонолов их содержание контролируется реакцией с 2,4-динитрофенилгидразином, что требует использования двух реагентов

для определения общего содержания флавоноидов в некоторых объектах анализа, таких как прополис [10].

Для определения конденсированных таннинов более избирательными являются методики, использующие в качестве реагентов ванилин или основанные на образовании малорастворимых солей с ионами металлов или протеинами [11]. Гидролизуемые таннины рекомендовано определять по реакции с йодатом калия [12]. Антоцианы избирательно поглощают в видимой области спектра. Их определяют методом pH-дифференциальной спектрофотометрии путем измерения оптической плотности образца при pH = 1 и 4.5 [13].

В предыдущей работе нами были рассмотрены особенности взаимодействия двух аналитических реагентов структуры Доусона – 18-молибдодифосфата и реактива ФЧ с индивидуальными представителями различных классов фенольных соединений, характерных для растительных объектов, а также с соединениями, которые могут оказывать мешающее влияние на определение фенолов. Был сделан вывод о подобию реакционного поведения этих двух веществ [3]. Учитывая разнообразие фенолов в растениях и наличие в них восстановителей нефенольного происхождения было целесообразно подтвердить сделанные выводы на примере анализа достаточно большого числа объектов, включая растения и ряд лекарственных препаратов на основе природных компонентов.

Целью данной работы являлось установление соответствия между результатами определения общего содержания фенолов в растительных препаратах методиками, использующими, с одной стороны, 18-МФК и реактив ФЧ, а, с другой, 18-МФК и хлорид алюминия.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ДАННЫЕ

В качестве объектов анализа использовали препараты на основе растительного сырья: «Настойка боярышника» (Виола), «Календула настойка» (Виола), «Софора японская настойка» (Виола), «Солодки корня сироп» (Луганский ФЗ), экстракт «Ротокана», содержащий смесь жидких экстрактов ромашки, календулы и тысячелистника, а также вспомогательные вещества, «Кратал» (Борщаговский ХФЗ), в состав которого входят таурин, смесь сухих экстрактов боярышника и пустырника, «Гинкофар» (БИОФАРМА) в качестве основы содержащий сухой экстракт гинкго билобы, «Микстура от кашля дет.» (Тернофарм), содержащая смесь сухого экстракта корня алтея и корня солодки, «Фла-

мин таб. 0.05 г» (Здоровье), содержащий концентрат бессмертника песчаного, «Альтан» – комплексный препарат из веществ полифенольной природы – производных эллаготанинов (эллаговая и галловые кислоты, этилгаллат, альнитанин и др.), полученный из соплодий ольхи клейкой и ольхи серой (ЗАО НПЦ «Борщаговский химико-фармацевтический завод», Украина). «Осокор» – диетическая добавка, содержащая сухой экстракт гинкго билобы, биофлавоноиды цитрусовых и аскорбиновую кислоту, «Формула 3» – диетическая добавка («Сибирское здоровье», Россия), спиртовую вытяжку чая зелёного «Кволити». В круглых скобках указана фирма-производитель.

При анализе цедры цитрусовых (апельсина, грейпфрута, лимона), цветов гибискуса, граната, цветов и плодов шиповника, листьев чая использовали водно-спиртовую экстракцию. К измельченной навеске 5 г цедры цитрусовых и плодов шиповника или 2.5 г цветов гибискуса, граната и шиповника, или 0.25 г листьев чая добавляли 25 мл этилового спирта, кипятили с обратным холодильником в течение 2 часов. Полученный раствор фильтровали через воронку Бюхнера. Экстракты центрифугировали 5 минут при 4000 оборотов / минуту.

Подготовку настоек и сиропов для проведения анализа проводили следующим образом: 1 мл исследуемого раствора разбавляли в 10 мл спирта и отфильтровывали нерастворимый остаток. Готовый раствор хранили не более суток.

Для проведения пробоподготовки таблеток на основе растительного сырья использовали следующий порядок: растирали в ступке 5 таблеток до порошкообразного состояния, взвешивали навеску порошка, равную по массе одной таблетке, растворяли в 10 мл спирта при температуре 40–50 °С и отфильтровывали.

Для определения суммы фенольных соединений анализируемого образца неизвестного состава измеренное светопоглощение пересчитывали в единицы концентрации по градуировочному графику, полученному для стандартного полифенола, например рутина. Поэтому полученный результат является усреднённым аналитическим откликом всех фенольных соединений, содержащихся в объекте анализа.

Определение общего содержания полифенолов с 18-МФК при pH = 7.4. В мерную колбу на 25 мл вносили аликвоту исследуемого раствора,

0.8 мл $5 \cdot 10^{-3}$ моль/л 18-МФК, 5 мл фосфатного буферного раствора с pH = 7.4, доводили объём дистиллированной водой до метки. Измеряли оптическую плотность через 15 мин при 820 нм.

Определение общего содержания полифенолов с 18-МФК при pH = 9.5 проводили аналогично, используя вместо 5 мл фосфатного буферного раствора с pH = 7.4, 3 мл боратного буферного раствора с pH = 9.5.

Определение общего содержания полифенолов с хлоридом алюминия. В пробирке смешивали исследуемый раствор, 0.2 мл 10 % мас. $AlCl_3$, 0.2 мл 1 моль/л ацетатного буферного раствора (pH = 4.3), доводили объём до 10 мл. Оптическую плотность измеряли через 30 минут при 410 нм.

Определение общего содержания полифенолов с реактивом Фолина-Чокальтеу. В колбе на 25 мл смешивали исследуемый раствор, 0.3 мл реактива, 3 мл 20 % мас. Na_2CO_3 , доводили объём до метки. Светопоглощение растворов измеряли через 20 минут при 720 нм.

Спектры поглощения в УФ и видимой областях измеряли при помощи спектрофотометра СФ-26. pH измеряли на иономере ЭВ-74 с использованием индикаторного стеклянного электрода и хлорид-серебряного электрода сравнения.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Сравнительная характеристика результатов определения общего содержания фенолов с использованием $AlCl_3$, 18-МФК и реактива ФЧ

Хлорид алюминия является стандартным реагентом, широко используемым для оценки общего содержания флавоноидов. В данной работе на примере анализа многочисленной группы растительных препаратов разнообразного состава были подтверждены некоторые выводы о его реакционной способности в отношении групп полифенолов, сделанные ранее [8, 9] и проведена корреляция с результатами анализа, получаемыми с использованием 18-МФК и реактива ФЧ.

Флавонолы являются группой полифенолов, широко представленных в растениях. В том случае, когда они преобладают среди других фенольных соединений, результаты определения всеми тремя исследуемыми методами оказываются очень близкими (табл. 1 и 2). Примером этого являются

Таблица 1

Суммарное содержание фенолов в сиропах и настойках на основе растительного сырья в пересчете на рутин, найденное с использованием 18-МФК, $AlCl_3$ и реактива Фолина-Чокальтеу, мг / 10 мл $\pm \Delta (S_r)$, $n = 6$, $P = 0.95$

Исследуемый объект	$AlCl_3$	18-МФК pH = 7.4	Реактив ФЧ
Софора японская [14]	$10.34 \pm 0.07 (0.006)$	$10.62 \pm 0.29 (0.018)$	$10.92 \pm 0.17 (0.015)$
Календула [15]	$10.98 \pm 0.16 (0.015)$	$14.50 \pm 0.29 (0.019)$	$14.71 \pm 0.27 (0.018)$
Солодка [16]	$11.03 \pm 0.16 (0.015)$	$12.85 \pm 0.42 (0.033)$	$15.69 \pm 0.43 (0.027)$
Боярышник [17]	$4.88 \pm 0.16 (0.032)$	$11.01 \pm 0.49 (0.045)$	$11.50 \pm 0.27 (0.023)$
«Ротокан» [15, 18, 19]	$9.4 \pm 0.3 (0.05)$	$11.02 \pm 0.23 (0.019)$	$9.44 \pm 0.21 (0.026)$

Таблица 2

Суммарное содержание фенолов в препаратах на основе растительного сырья и биологически активных добавках в пересчете на рутин, найденное с использованием 18-МФК, AlCl_3 и реактива Фолина-Чокальтеу, мг / табл. $\pm \Delta (S_r)$, $n = 6$, $P = 0.95$

Исследуемый объект	AlCl_3	18-МФК pH = 7.4	Реактив ФЧ
«Гинкофар» [20]	$3.60 \pm 0.042 (0.010)$	$3.70 \pm 0.045 (0.012)$	$3.91 \pm 0.041 (0.011)$
«Фламин» [21]	$6.92 \pm 0.06 (0.009)$	$11.59 \pm 0.18 (0.016)$	$11.1 \pm 0.09 (0.008)$
«Осокор» [20, 22-25]	$0.20 \pm 0.006 (0.026)$	$3.36 \pm 0.07 (0.021)$	$3.4 \pm 0.05 (0.016)$
«Формула 3»	мутный р-р	$6.76 \pm 0.07 (0.011)$	$6.58 \pm 0.12 (0.018)$
Микстура от кашля детская* [16, 26]	$15.85 \pm 0.36 (0.022)$	$23.91 \pm 0.27 (0.012)$	$23.24 \pm 0.26 (0.011)$
«Кратал» [17, 27]	$0.94 \pm 0.022 (0.021)$	$12.71 \pm 0.27 (0.021)$	$11.68 \pm 0.13 (0.011)$
«Альтан»	$0.7 \pm 0.02 (0.15)$	$5.21 \pm 0.13 (0.020)$	$4.23 \pm 0.34 (0.06)$

Примечание: * – содержание указано в 100 мл раствора

результаты анализа софоры, в которой доминирует рутин, «Ротокана» (ромашка (апигенин)), календула (рутин, изокверцетин), тысячелистника (лютеолин, апигенин), «Гинкофара», содержащего гинго билобу (кемпферол, кверцетин, изорамнетин). К этой же группе объектов анализа можно отнести плоды лимона и апельсина, содержащие преимущественно флавононы (нарингенин и гесперидин, соответственно) (табл. 3).

В корне солодки, плодах боярышника, цветках календулы содержание полифенолов, определенное с помощью хлорида алюминия меньше, чем с 18-МФК и реактивом ФЧ (табл. 1). Это, очевидно, связано с наличием в этих образцах групп соединений, которые или не реагируют с хлоридом алюминия или поглощение их комплексов находится в УФ области: в плодах боярышника – катехинов, фенольных кислот, аскорбиновой кислоты, в корне солодки – ликвиритина (окси-группы в положении 3 и 5 отсутствуют) и галлотаннинов, в календуле – галловой кислоты.

Для большинства изученных объектов использование хлорида алюминия приводит к сильно заниженным результатам по сравнению с 18-МФК и реактивом ФЧ (табл. 2 и 3). Двукратное занижение результатов определения фенолов в «Фламине» (препарате на основе цветов бессмертника) обу-

словлено тем, что в нем примерно в равных долях присутствуют флавонолы и фенольные кислоты, среди которых преобладает хлорогеновая кислота.

При анализе «Микстуры от кашля» на основе корней алтея и солодки или «Кратала» (экстракты боярышника и пустырника) метод с AlCl_3 не учитывает наличие катехинов, лейкоантоцианов, фенольных кислот, в препарате «Альтан» и цветах шиповника – эллаготаннинов, в зеленых чаях – катехинов, в кофе – хлорогеновой кислоты, в гранате – таннинов, сумaxe – фенольных кислот и галлотаннинов. При анализе БАД «Формула-3» ион алюминия образует малорастворимые соединения с компонентами, входящими в его состав. Приведенные результаты подтверждают сделанный в [8, 9] вывод о том, что при использовании в качестве реагента для определения суммы фенольных соединений хлорида алюминия для такого определения термин «общее содержание флавоноидов» применим лишь в строго определенных случаях.

При определении полифенолов в цветках гибискуса и граната, плодах шиповника с хлоридом алюминия в спектре наблюдаются две слабо перекрывающиеся полосы с максимумом поглощения при 410 нм (комплекс алюминия с флавонолами) и 520 нм (собственное поглощение антоцианов).

Таблица 3

Суммарное содержание фенолов в растительных объектах в пересчете на рутин, найденное с использованием 18-МФК, AlCl_3 и реактива Фолина-Чокальтеу, мг рутина / г $\pm \Delta (S_r)$, $n = 5$, $P = 0.95$

Исследуемый объект	AlCl_3	18-МФК pH = 7.4	18-МФК pH = 9.5	Реактив ФЧ
Грейпфрут [22-25]	$4.73 \pm 0.15 (0.028)$	$2.21 \pm 0.028 (0.011)$	$4.40 \pm 0.090 (0.017)$	$6.1 \pm 0.4 (0.05)$
Апельсин [22-25]	$2.13 \pm 0.10 (0.042)$	$2.07 \pm 0.12 (0.048)$	$5.34 \pm 0.14 (0.018)$	$4.59 \pm 0.10 (0.020)$
Лимон [22-25]	$10.4 \pm 1.4 (0.12)$	$6.26 \pm 0.47 (0.07)$	$9.4 \pm 0.8 (0.07)$	$10.2 \pm 0.7 (0.06)$
Чай зелёный [28]	$16.3 \pm 1.1 (0.06)$	$187 \pm 17 (0.08)$	$264 \pm 20 (0.05)$	$209 \pm 15 (0.05)$
Гибискус [29]	$12.3 \pm 1.4 (0.10)$	$26.1 \pm 1.8 (0.06)$	–	$26.1 \pm 2.7 (0.09)$
Гранат [30]	$1.3 \pm 0.14 (0.10)$	$6.67 \pm 0.063 (0.008)$	–	$4.97 \pm 0.11 (0.019)$
Шиповник плоды [31]	$0.32 \pm 0.06 (0.10)$	$3.96 \pm 0.13 (0.027)$	–	$3.69 \pm 0.14 (0.032)$
Шиповник цветы [32]	–	$8.77 \pm 0.53 (0.046)$	–	$6.7 \pm 0.8 (0.10)$
Сумах [33]	$21.6 \pm 2.1 (0.08)$	$100 \pm 18 (0.14)$	$142 \pm 10 (0.06)$	$138 \pm 12 (0.07)$
Кора дуба [34]	$1.82 \pm 0.16 (0.07)$	$15.9 \pm 1.6 (0.08)$	$21.2 \pm 0.7 (0.027)$	$21.7 \pm 0.6 (0.022)$
Кофе [23]	$12.0 \pm 1.3 (0.09)$	$95.4 \pm 1.7 (0.014)$	$92.4 \pm 2.6 (0.023)$	$81.3 \pm 1.9 (0.019)$
Лопух [23]	–	$1.92 \pm 0.05 (0.023)$	$2.50 \pm 0.10 (0.034)$	$2.91 \pm 0.14 (0.04)$
Шелковица белая плоды [35]	–	–	$0.443 \pm 0.012 (0.023)$	$0.355 \pm 0.013 (0.03)$

Примечание «–» – нет данных.

Большая часть спектра ГПС также не перекрывается со спектром антоцианов. Антоцианы не окисляются ни 18-МФК, ни реактивом ФЧ. Поэтому оценка содержания полифенолов в этих образцах на основании реакции с 18-МФК и реактивом ФЧ учитывает вклад флавонолов и фенольных кислот, а в случае хлорида алюминия – только флавонолов.

2. Сравнение результатов определения общего содержания фенольных соединений с использованием 18-МФК и реактива ФЧ

Для большинства исследованных растительных образцов результаты анализа, полученные с использованием 18-МФК при pH = 7.4 и реактива ФЧ, хорошо коррелируют между собой, коэффициент корреляции составляет 0.955 (табл. 1 и 2). Тангенс угла наклона данной зависимости незначимо отличается от единицы (0.97 ± 0.06), а свободный член от нуля (0.3 ± 0.7) (в скобках указаны значения коэффициентов b и a в уравнении регрессии прямой линии и их стандартные отклонения, рассчитанные методом наименьших квадратов). Для данных табл. 3 (исключая часть данных для 18-МФК, полученных для pH = 9.5) аналогичная корреляционная зависимость описывается уравнением: $C_{(18-МФК)} = 2.3 \pm 2.2 + (0.825 \pm 0.025) \times C_{(реактив ФЧ)}$, $R^2 = 0.996$.

Столь же высокая степень корреляции наблюдается и для обобщенных данных, полученных для объектов анализа из всех трех таблиц (рисунков). Коэффициент корреляции составил 0.988.

Содержания полифенолов для сравниваемых методик не просто коррелируют, но и близки по абсолютной величине. Это объясняется тем, что кажущиеся молярные коэффициенты для большой группы полифенолов в среднем мало отличаются друг от друга. Приведенные многочисленные примеры анализа реальных растительных препаратов доказывают общность химического поведения 18-МФК и реактива ФЧ в отношении фенолов, обусловленную аналогией в структуре и близостью окислительно-восстановительных потенциалов этих гетерополикомплексов.

Правильность и правильный выбор стандарта при построении градуировочного графика для пред-

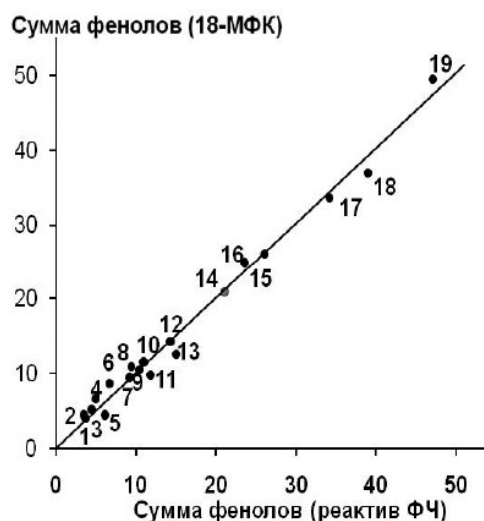


Рис. Корреляционная зависимость между значениями общего содержания полифенолов в растительных объектах в пересчете на рутин, найденными с использованием реактива Фолина-Чокальтеу и 18-МФК: 1 – плоды шиповника, 2 – шелковица, 3 – апельсин, 4 – гранат, 5 – грейпфрут, 6 – цветы шиповника, 7 – лимон, 8 – «Ротокан», 9 – «Фламин», 10 – «Софора японская», 11 – «Настойка боярышника», 12 – «Настойка календулы», 13 – «Солодки корень, сироп», 14 – кора дуба, 15 – «Микстура от кашля детская», 16 – гибискус, 17 – «Осокор», 18 – «Гинкофар», 19 – «Кратал». Единицы содержания полифенолов на рисунке соответствуют единицам, указанным в табл. 1-3.

ложенной методики подтверждается и сравнением полученных результатов анализа растительных объектов с типичными значениями содержания суммы полифенолов, найденными в литературе (табл. 4). Найденные содержания полифенолов попадают в интервалы концентраций, характерных для данного растительного объекта, или достаточно близки к ним. В отдельных случаях полученные расхождения были большими, что может быть связано с использованием разных стандартов, сильной зависимостью состава растительного объекта от страны происхождения, части растения, которая анализировалась, времени сбора и т.п.

pH = 7.4 может быть рекомендован для определения суммы фенолов в том случае, если в об-

Таблица 4

Сравнение результатов определения, полученных предлагаемой методикой с 18-МФК, и литературных данных о содержании полифенольных соединений в некоторых растительных объектах в пересчете на рутин

Образец	Литературные данные	Найдено с 18-МФК
Апельсин, мг/100 г	517 – 621	530
Грейпфрут, г/100 г	0.38 – 1.08	0.44
Зелёный чай, мг/г	145 – 200	264
Цветы гибискуса, мг/г	78 (с учётом антоцианов) 54 (без учёта антоцианов)	26
Софора, мг/г	200 – 270	530
Боярышник настойка, г/мл	1.8 – 2.2	1.1
Календула, мг/г	148	145
Лопух, мг/г	4.9	2.5

Примечание: найденные в литературе значения содержания полифенолов пересчитаны на рутин.

разце преобладают флавонолы (софора, календула, гинкго билоба). Если общее содержание полифенолов наряду с флавонолами определяется присутствием оксикоричных кислот, то результаты определения также оказываются очень близкими при использовании обоих рассматриваемых реагентов («Ротокан», «Фламин», «Микстура от кашля», гибискус, гранат, кофе). Небольшая доля флаванов в такой смеси фенольных соединений также не влияет существенно на близость результатов («Кратал»). Такой же вывод справедлив и в случае, если в состав растительного препарата наряду с флавонолами входят эллаговая кислота или эллаготанины («Альтан», шиповник).

При анализе спиртовых вытяжек из цедры цитрусовых фруктов содержание полифенолов, определённое с 18-МФК при $\text{pH} = 7.4$, оказывается существенно меньшим, чем с реагентом ФЧ, а при $\text{pH} = 9.5$ примерно одинаковым. Поскольку окисление флавононов, некоторых фенольных кислот, катехинов и таннинов с 18-МФК при $\text{pH} = 7.4$ и рекомендуемым временем 15 минут протекает не полностью, кажущиеся молярные коэффициенты, рассчитанные для реакций полифенолов с 18-МФК при $\text{pH} = 7.4$ и 9.5, могут сильно отличаться. Примером служит преобладающий в составе цитрусовых фруктов флавоноид гесперидин, кажущийся молярный коэффициент которого при $\text{pH} = 7.4$ составляет $2.8 \cdot 10^3 \text{ моль}^{-1} \cdot \text{л} \cdot \text{см}^{-1}$, а при $\text{pH} = 9.5$ – $1.4 \cdot 10^4 \text{ моль}^{-1} \cdot \text{л} \cdot \text{см}^{-1}$. Присутствующие в сумaxe, коре дуба большие количества оксикоричных кислот, полимерных полифенолов, а в боярышнике и зеленом чае – катехинов обуславливают малую скорость взаимодействия с 18-МФК при $\text{pH} = 7.4$. Поэтому определение полифенолов, обладающих невысокой реакционной способностью, с 18-МФК рекомендуем проводить при $\text{pH} > 9.0$.

Для «Микстуры от кашля», «Кратала», «Альтана» зелёного чая, в которых преобладают таннины и катехины, небольшое завышение результатов анализа с 18-МФК по сравнению с реагентом ФЧ объясняется различиями в величинах кажущихся молярных коэффициентов. Например, для реакции галлотанина с 18-МФК он составляет $2.4 \cdot 10^5 \text{ моль}^{-1} \cdot \text{л} \cdot \text{см}^{-1}$, а для реагента ФЧ – $1.4 \cdot 10^5 \text{ моль}^{-1} \cdot \text{л} \cdot \text{см}^{-1}$.

Наиболее сложно найти вероятные причины расхождений результатов определения рассмотренными реагентами в том случае, если при использовании реагента ФЧ получается существенное завышение найденного содержания суммы фенолов по сравнению с 18-МФК (солодка, боярышник, грейпфрут), поскольку полная информация о реакционной способности обоих реагентов по отношению, как к отдельным представителям полифенольных соединений, так и веществам нефенольного происхождения пока отсутствует.

Выводы

Результаты анализа ряда лекарственных растений подтверждают сделанный ранее [8, 9] вывод о том, что широко используемая методика, часто декларируемая как способ для оценки общего содержания флавоноидов и основанная на измерении светопоглощения при 410–430 нм после добавления хлорида алюминия, является селективной только для флавонов, имеющих в молекуле гидроксильные группы в положении 3 и/или 5. Для растений, в которых доминируют флавонолы, результаты полученные с применением этой методики хорошо сопоставимы с результатами определения общего содержания фенолов с использованием реагентов ФЧ или 18-МФК.

За небольшими исключениями наблюдается высокая степень корреляции и даже близость результатов определения общего содержания полифенолов с использованием реагентов структуры Доусона – реагента ФЧ и 18-МФК. Различия в составе гетерополианионов (для реагента ФЧ в анионе преобладают атомы вольфрама, а в состав аниона 18-МФК входят только атомы молибдена) не влияют существенно на реакционную способность и на кажущиеся молярные коэффициенты поглощения, получаемые для реакций с представителями различных классов полифенольных соединений.

Если общее содержание полифенолов определяется присутствием флавонолов или оксикоричных кислот, то взаимодействие последних с 18-МФК является быстрым и полным при проведении реакции при $\text{pH} = 7.4$. Для определения менее реакционноспособных фенольных соединений (полимерные полифенолы, катехины, оксикоричные кислоты) оптимальной является область pH выше 9.0.

18-МФК является реагентом, который можно с успехом использовать вместо реагента ФЧ для определения общего содержания фенольных соединений. В ряде случаев может оказаться полезным, что 18-МФК меньше учитывает при определении данного или других интегральных показателей, таких как антиоксидантная активность или пищевая полезность, влияние ряда восстановителей нефенольного характера, к примеру, восстанавливающих сахаров, аминокислот или аминов, простых фенолов.

Важно и то, что только с 18-МФК удается просто вычестить вклад более активных, чем полифенолы, веществ, проявляющих восстановительные свойства, например, аскорбиновой кислоты. Только для 18-МФК при условии измерения при длине волны, соответствующей изобестической точке в спектрах ГПС, получаемых при реакции с фенолами, градуировочная зависимость является линейной в широком интервале концентраций. Реакция 18-МФК с полифенолами, в общем, является более быстрой, измеренная величина поглощения более стабильной и меньше зависит от варьирования условий определения.

ЛИТЕРАТУРА

- Scalbert A., Williamson G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols // *J. Nutrition*. 2000. V. 130, № 8. P. 2073-2085.
- Flavonoids: chemistry, biochemistry, and applications; Ed. O.M. Andersen, K.R. Markham. Taylor&Francis, 2006. 1197 p.
- Денисенко Т.А., Вишник А.Б., Цыганок Л.П. Особенности взаимодействия 18-молибдодифосфата и реактива Фолина-Чокальтеу с фенольными соединениями // *Аналитика и контроль*. 2015. Т. 19, № 3. С. 242-251.
- Singleton V.L., Orthofer R., Lamuela-Raventos R.M. Analysis of total phenols and other oxidations substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent // *Methods in enzymology*. 1999. V. 299. P. 152-178.
- Томсон Р.Х. Структура и реакционная способность фенольных соединений. Биохимия фенольных соединений. Под ред. Дж. Харборна. М., Мир, 1968. 448 с.
- Roginsky V., Lissi E.A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food // *Food Chem*. 2005. V. 92, № 2. P. 235-254.
- Prior R.L., Wu X., Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements // *J. Agric. Food Chem*. 2005. V. 53, № 10. P. 4290-4302.
- Jurd L. Aluminium complexes of phenolic flavones. Spectral and structural correlation // *Phytochemistry*. 1969. V. 8. P. 445-462.
- Pękal A., Pyrzynska K. Evaluation of aluminium complexation reaction for flavonoid content assay // *Food Anal. Methods*. 2014. V. 7, № 9. P. 1776-1782.
- Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods / C.-C. Chang [et al.] // *J. Food Drug Anal*. 2002. V. 10, № 3. P. 178-182.
- Ferreira E.C., Nogueira A.R.A. Vanillin-condensed tannin study using flow injection spectrophotometry // *Talanta*. 2000. V. 51, № 1. P. 1-6.
- Determination of hydrolyzable tannins (gallotannins and ellagitannins) after reaction with potassium iodate / P.W. Hartzfeld [et al.] // *J. Agric. Food Chem*. 2002. V. 50, № 7. P. 1785-1790.
- Lee J., Durst R.W., Wrolstad R.E. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: collaborative study // *J. AOAC Int*. 2005. V. 88, № 5. P. 1269-1278.
- Gevrenova R., Kitanov G., Ilieva D. Ontogenetic and seasonal variation in the flavonoid composition of *Sophora japonica* cultivated in Bulgaria // *Pharm. Biol*. 2007. V. 45, № 2. P. 149-155.
- Спектрофотометрическое определение флавоноидов в растительном сырье / А.В. Булатов [и др.] // *Аналитика и контроль*. 2012. Т. 16, № 4. С. 358-362.
- Wojdyło A., Oszmianski J., Czemerys R. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs // *Food Chem*. 2007. V. 105, № 3. P. 940-949.
- Free radical-scavenging activities of *Crataegus monogyna* extracts / J. Bernatoniene [et al.] // *Medicina (Kaunas)*. 2008. V. 44, № 9. P. 706-712.
- Верниковская Н.А., Темердашев З.А. Идентификация и хроматографическое определение фенольных соединений в тысячелистнике обыкновенном // *Аналитика и контроль*. 2012. Т. 16, № 2. С. 189-195.
- Analysis of phenolic compounds in *Matricaria chamomilla* and its extracts by UPLC-UV / G. Haghi [et al.] // *Res. Pharm. Sci*. 2014. V. 9, № 1. P. 31-37.
- Comparative analysis of pharmaceuticals and dietary supplements containing extracts from the leaves of *Ginkgo biloba* / A. Gawron-Gzella [et al.] // *Acta Poloniae Pharm. Drug Res*. 2010. V. 67, № 4. P. 335-343.
- Phenolic composition and antioxidant capacities of *Helichrysum simplicatum* / S. Kolaylı [et al.] // *Hacettepe J. Biol. Chem*. 2010. V. 38, № 4. P. 269-276.
- Determination of flavonoids in a Citrus fruit extract by LC-DAD and LC-MS / Mata Bilbao M.L. [et al.] // *Food Chem*. 2007. V. 101, № 4. P. 1742-1747.
- Simultaneous determination of all polyphenols in vegetables, fruits, and teas / H. Sakakibara [et al.] // *J. Agric. Food Chem*. 2005. V. 53, № 3. P. 4290-4302.
- Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay / R. Apak [et al.] // *Molecules*. 2007. V. 12, № 7. P. 1496-1547.
- Determination of naringin and hesperidin in citrus fruit by high-performance liquid chromatography the antioxidant potential of citrus fruit / S. Gorinstein [et al.] // *Acta Chromatographica*. 2006. V. 17. P. 108-123.
- Биохимический состав алтея лекарственного сорта «Рассвет» при интродукции в Беларусь / Л.В. Кухарева [и др.] // *Труды БГУ*. 2010. Т. 5, часть 2. С. 44-48.
- The comparison of anti-oxidative kinetics in vitro of the fluid extract from maidenhair tree, motherwort and hawthorn / J. Bernatoniene [et al.] // *Acta Poloniae Pharm. Drug Res*. 2009. V. 66, № 4. P. 415-421.
- Zuo Y., Chen H., Deng Y. Simultaneous determination of catechins, caffeine, gallic acids in green, Oolong, Black and pu-erh teas using HPLS with a photodiode array detector // *Talanta*. V. 57, № 2. P. 307-316.
- Total phenolic contents and antioxidant activities of pomegranate peel, seed, leaf and flower / W. Elfalleh [et al.] // *J. Medicinal Plants Res*. 2012. V. 6. P. 4724-4730.
- Dietary fiber content and associated antioxidant compounds in Roselle flower (*Hibiscus sabdariffa* L.) beverage / S.G. Sáyago-Ayerdi [et al.] // *J. Agric. Food Chem*. 2007. V. 55, № 19. P. 7886-7890.
- Матасов С.А., Рыжова Г.Л., Дычко К.А. Химический состав сухого водного экстракта из шрота шиповника // *Химия растительного сырья*. 1997. Т. 1, № 2. С. 28-31.
- Nowak R., Gawlik-Dziki U. Polyphenols of *Rosa L.* leaves extracts and their radical scavenging activity // *Z. Naturforsch.*, 2007. V. 62c, № 1-2. P. 32-38.
- Al-Boushl M.A., Hamdo H.H., Herball J. Extraction and study of the phenolic compounds in the leaves and sticks of the Syrians umacplant (*Rhus coriaria* L.) // *Int. J. Chem. Tech. Res*. 2014. V. 6, № 4. P. 2414-2420.
- Cabrita M. J., Baroccas Dias C., Costa Freitas A.M. Phenolic acids, phenolic aldehydes and furanic derivatives in oak chips: American vs. french oaks // *South Afric. J. Enol.Vitic*. 2011. V. 32, № 2. P. 204-210.
- Free radical scavenging activity and total phenolic and flavonoid contents of mulberry (*Morus* spp. L., *Moraceae*) extracts / M.M. Radojković [et al.] // *Hem. ind*. V. 66, № 4. P. 547-552.

REFERENCES

- Scalbert A., Williamson G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J. Nutrition*, 2000, vol. 130, no. 8, pp. 2073-2085.
- Flavonoids: chemistry, biochemistry, and applications. O.M. Andersen, K.R. Markham (Ed.). Taylor&Francis, 2006. 1197 p.
- Denisenko T.A., Vishnikin A.B., Tsyganok L.P. [Osobennosti vzaimodeystviya 18-molibdodifosfata i reaktivа Folina-Chokal'teu s fenol'nymi soedineniyami]. *Analitika i kontrol'* [Analytics and Control] 2015, vol. 19, no 3, pp. 242-251 (in Russian).

4. Singleton V.L., Orthofer R., Lamuela-Raventos R.M. Analysis of total phenols and other oxidations substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in enzymology*, 1999, vol. 299, pp. 152-178. doi: 10.1016/S0076-6879(99)99017-1.
5. Tomson R.X. Структура i reaktsionnaya sposobnost' fenol'nykh soedinenii. Biokhimiya fenol'nykh soedinenii. Pod red. Dzh. Kharborna. M., Mir, 1968. 448 p. (in Russian).
6. Roginsky V., Lissi E.A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food // *Food Chem.*, 2005, vol. 92, no. 2, pp. 235-254. doi:10.1016/j.foodchem.2004.08.004.
7. Prior R.L., Wu X., Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.*, 2005, vol. 53, no. 10, pp. 4290-4302. doi: 10.1021/jf0502698.
8. Jurd L. Aluminium complexes of phenolic flavones. Spectral and structural correlation. *Phytochemistry*, 1969, vol. 8, pp. 445-462. doi: 10.1016/S0031-9422(00)85447-3.
9. Pękal A., Pyrzynska K. Evaluation of aluminium complexation reaction for flavonoid content assay. *Food Anal. Methods*, 2014, vol. 7, no. 9, pp. 1776-1782. doi: 10.1007/s12161-014-9814-x.
10. Chang C.-C., Yang M.-H., Wen H.-M., Chern J.-C. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *J. Food Drug Anal.*, 2002, vol. 10, no. 3, pp. 178-182.
11. Ferreira E.C., Nogueira A.R.A. Vanillin-condensed tannin study using flow injection spectrophotometry. *Talanta*, 2000, vol. 51, no. 1, pp. 1-6. doi: 10.1016/S0039-9140(99)00222-2.
12. Hartzfeld P.W., Forkner R., Hunter M.D., Hagerman A.E. Determination of hydrolyzable tannins (gallotannins and ellagitannins) after reaction with potassium iodate. *J. Agric. Food Chem.*, 2002, vol. 50, no. 7, pp. 1785-1790. doi: 10.1021/jf0111155.
13. Lee J., Durst R.W., Wrolstad R.E. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: collaborative study. *J. AOAC Int.*, 2005, vol. 88, no. 5, pp. 1269-1278.
14. Gevrenova R., Kitanov G., Ilieva D. Ontogenetic and seasonal variation in the flavonoid composition of *Sophora japonica* cultivated in Bulgaria. *Pharm. Biol.*, 2007, vol. 45, no. 2, pp. 149-155. doi: 10.1080/13880200601113123.
15. Bulatov A.V., Fal'kova M.T., Pushina M.O., Moskvina L.N., Alekseeva G.M. [Spektrofotometricheskoe opredelenie flavonoidov v rastitel'nom syr'e]. *Analitika i kontrol'* [Analytics and Control], 2012, vol. 16, no. 4, pp. 358-362 (in Russian).
16. Wojdyło A., Oszmianski J., Czemerys R. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chem.*, 2007, vol. 105, no. 3, pp. 940-949. doi: 10.1016/j.foodchem.2007.04.038.
17. Bernatoniene J., Masteikova R., Majienė D., Savickas A., Kėvelaitis E., Bernatoniene R., Dvoráčková K., Civinskienė G., Lekas R., Vitkevičius K., Pečiūra R. Free radical-scavenging activities of *Crataegus monogyna* extracts. *Medicina (Kaunas)*, 2008, vol. 44, no. 9, pp. 706-712.
18. Vernikovskaya N.A., Temerdashev Z.A. [Identifikatsiya i khromatograficheskoe opredelenie fenol'nykh soedinenii v tysiachelistnike obyknovennom]. *Analitika i kontrol'* [Analytics and Control], 2012, vol. 16, no. 2, pp. 189-195 (in Russian).
19. Haghi G., Hatami A., Safaei A., Mehran M. Analysis of phenolic compounds in *Matricaria chamomilla* and its extracts by UPLC-UV. *Res. Pharm. Sci.*, 2014, vol. 9, no. 1, pp. 31-37.
20. Gawron-Gzella A., Marek P., Chanaj J., Matlowski. Comparative analysis of pharmaceuticals and dietary supplements containing extracts from the leaves of *Ginkgo biloba* L. *Acta Poloniae Pharm. Drug Res.*, 2010, vol. 67, no. 4, pp. 335-343.
21. Kolaylı S., Şahin H., Ulusoy E., Tarhan Ö. Phenolic composition and antioxidant capacities of *Helichrysum plicatum*. *Hacettepe J. Biol. Chem.*, 2010, vol. 38, № 4, pp. 269-276.
22. Mata Bilbao M.L., Andrés-Lacueva C., Jáuregui O., Lamuela-Raventos, R.M. Determination of flavonoids in a Citrus fruit extract by LC-DAD and LC-MS. *Food Chem.*, 2007, vol. 101, no. 4, pp. 1742-1747. doi: 10.1016/j.foodchem.2006.01.032.
23. Sakakibara H., Honda Y., Nakagawa S., Ashida H., Kanazawa K. Simultaneous determination of all polyphenols in vegetables, fruits, and teas. *J. Agric. Food Chem.*, 2005, vol. 53, no. 3, pp. 4290-4302. doi: 10.1021/jf020926l.
24. Apak R., Güçlü K., Demirata B., Özyürek M., Çelik S.E., Bektaşoğlu B., Berker K.I., Özyurt D. Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRA Cassay. *Molecules*, 2007, vol. 12, no. 7, pp. 1496-1547. doi:10.3390/12071496.
25. Gorinstein S., Huang D., Leontowicz H., Leontowicz M., Yamamoto K., Soliva-Fortuny R., Martin Belloso O., Martinez Ayala A.L., Trakhtenberg S. Determination of naringin and hesperidin in citrus fruit by high-performance liquid chromatography. The antioxidant potential of citrus fruit. *Acta Chromatographica*, 2006, vol. 17, pp. 108-123.
26. Kukhareva L.V., Ignatenko V.A., Gil' T.V., Kot A.A. [Biokhimicheskii sostav alteia lekarstvennogo sorta «Rassvet» pri introduktsii v Belarus']. *Trudy BGU* [Proceedings BGU] 2010, vol. 5, chast' 2, pp. 44-48 (in Russian).
27. Bernatoniene J., Kucinskaite A., Masteikova R., Kalveniene Z., Kasparaviciene G., Savickas A. The comparison of anti-oxidative kinetics in vitro of the fluid extract from maidenhair tree, motherwort and hawthorn. *Acta Poloniae Pharm. Drug Res.*, 2009, vol. 66, no. 4, pp. 415-421.
28. Zuo Y., Chen H., Deng Y. Simultaneous determination of catechins, caffeine, gallic acids in green, Oolong, Black and pu-erh teas using HPLS with a photodiode array detector. *Talanta*, 2002, vol. 57, no. 2, pp. 307-316.
29. Elfalleh W., Hannachi H., Tili N., Yahia Y., Nasri N., Ferchichi A. Total phenolic contents and antioxidant activities of pomegranate peel, seed, leaf and flower. *J. Medicinal Plants Res.*, 2012, vol. 6, pp. 4724-4730. doi:10.5897/JMPR11.995.
30. Sáyago-Ayerdi S.G., Arranz S., Serrano J., Goñil. Dietary fiber content and associated antioxidant compounds in Roselle flower (*Hibiscus sabdariffa* L.) beverage. *J. Agric. Food Chem.*, 2007, vol. 55, no. 19, pp. 7886-7890. doi:10.1021/jf070485b.
31. Matasova S.A., Ryzhova G.L., Dychko K.A. [Khimicheskii sostav sukhogo vodnogo ekstrakta iz shrota shipovnika]. *Khimiya rastitel'nogo syr'ia* [Chemistry of plant raw materials], 1997, vol. 1, no. 2, pp. 28-31 (in Russian).
32. Nowak R., Gawlik-Dziki U. Polyphenols of *Rosa* L. leaves extracts and their radical scavenging activity. *Z. Naturforsch.*, 2007, vol. 62c, no. 1-2, pp. 32-38. doi: 10.1515/znc-2007-1-206.
33. Al-Boushl M.A., Hamdo H.H., Herball J. Extraction and study of the phenolic compounds in the leaves and sticks of the Syrian sumac plant (*Rhus coriaria* L.). *Int. J. ChemTech Res.*, 2014, vol. 6, no. 4, pp. 2414-2420.
34. Cabrita M.J., Barrocas Dias C., Costa Freitas A.M. Phenolic acids, phenolic aldehydes and furanic derivatives in oak chips: American vs. French oaks. *South Afric. J. Enol. Vitic.*, 2011, vol. 32, no. 2, pp. 204-210.
35. Radojković M.M., Zeković Z.P., Vidović S.S., Kočar D.D., Mašković P.Z. Free radical scavenging activity and total phenolic and flavonoid contents of mulberry (*Morus spp.* L., *Moraceae*) extracts. *Hem. ind.*, 2012, vol. 66, no. 4, pp. 547-552. doi:10.2298/HEMIND11111002R.